

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

AA



(51) 国際特許分類7 C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/06, C07K 16/18	A1	(11) 国際公開番号 WO00/31131 (43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06322 (22) 国際出願日 1999年11月12日(12.11.99) (30) 優先権データ 特願平10/347863 1998年11月19日(19.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO- THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒860-8568 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 平嶋正樹(HIRASHIMA, Masaki)[JP/JP] 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町須屋2629-5 Kumamoto, (JP) 前田浩明(MAEDA, Hiroaki)[JP/JP] 〒860-0076 熊本県熊本市壺川1丁目1-12 栄久ハイツ Kumamoto, (JP) 野崎周英(NOZAKI, Chikateru)[JP/JP] 〒862-8001 熊本県熊本市武蔵ヶ丘5丁目26-1 Kumamoto, (JP)		(74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: PEPTIDE FRAGMENTS HAVING CELL DEATH INHIBITORY ACTIVITY (54)発明の名称 細胞死抑制活性を有するペプチド断片 (57) Abstract Peptide fragment(s) having an activity of inhibiting cell death which contain the amino acid sequence consisting of 103 amino acid residues in the C-terminal side of selenoprotein P, an amino acid sequence derived from the above amino acid sequence by deletion, substitution or addition of one or several amino acids therein, or a partial sequence of either of the above amino acid sequences; remedies containing the above peptide fragment(s); antibodies against the above peptide fragment(s); and a method for screening a cell death inhibitory activity with the use of the above peptide fragment(s). Preferable examples of the above peptide fragment(s) are those containing the amino acid sequence(s) represented by SEQ ID NO:1 and/or 2 or partial sequences thereof.		

(57)要約

本願発明は、セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸残基からなる配列又は当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列又は前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列を有する、細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群、該ペプチド断片又はペプチド断片群を含む治療剤、該ペプチド断片又はペプチド断片群に対する抗体、及びペプチド断片又はペプチド断片群を用いた細胞死抑制活性のスクリーニング方法を提供する。本願発明の好ましいペプチド断片又はペプチド断片群は、配列番号1及び／又は配列番号2で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

細胞死抑制活性を有するペプチド断片

技術分野

本願発明は、新たな機能を有する蛋白質に関する。詳細には、本願発明は、細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群及びその精製方法並びに前記ペプチド断片又はペプチド断片群に対する抗体に関する。さらに詳細には、本願発明は、各種疾患例えば細胞死に関連した疾病に対する病態悪化阻止、予防又は治療剤及び細胞培養における細胞死を抑制することによる有用物質生産を可能にする添加物となりうるペプチド断片又はペプチド断片群並びに前記ペプチド断片又はペプチド断片群に対する抗体に関する。

背景技術

細胞死は、高等生物の神経系、内分泌系、免疫系における基本的な制御に重要な働きをしているばかりでなく、多くの疾病に深く関わっていることが指摘されている(Thompson C. B., Science, vol. 267, p. 1456-1462 (1995))。例えば、全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患、神経細胞死による神経変性疾患、臓器移植に伴う臓器移植傷害等、これらはアポトーシスが関与する細胞死の影響による疾患として捉えることができる。

ところで、細胞死を引き起こす要因には外的要因と内的要因がある。外的要因としては、細胞死を促進するものとして実体的に物質として捉えられているものは、免疫系に関与するTNF(Zheng L., et al., Nature, vol. 377, p. 348-351 (1995))、Fasリガンド(Suda T., et al., Cell, vol. 75, p. 1169-1178 (1993))、グルココルチコイド(Wyllie A. H., Nature, vol. 284, p. 555-556 (1980))等があり主としてこれらに起因するもの、他にも細胞増殖に必要なエリスロポエチン、インターロイキン、神経成長因子等の増殖因子や栄養因子の欠乏によるもの等があり、生理的条件の変化によってアポトーシスによる細胞死が惹起される。さらに、放射線、温度、制癌剤、カルシウムイオノフォア、活性酸素等による非生理的なストレスが情報となってアポトーシスが誘導される場合がある。他にも、火傷、毒物、虚血、補体攻撃、溶解性ウイルス感染、過剰な薬物投与や放射線投与によりネクローシスが生じる。

内的要因としては、細胞内 Ca^{2+} 濃度、核酸代謝、アミノ酸代謝、エネルギー代謝等の代謝系の変化などがあり、これら要因により細胞を死に至らしめる。これらのアポトーシスシグナルをコントロールすることができれば各種疾患の病態悪化阻止、予防又は治療に利用可能なはずであるが、機序が単純ではないため
5 現在確認されている物質・要因の制御だけでは医療への応用は実現困難な状況にある。

一方、現在までに確認されている細胞死を抑制する物質としては、ほとんどのアポトーシスシグナルを抑制するとされている細胞内因子である $bcl-2$ や $bcl-x$ 等が知られているが(Boise L.H., et al., Cell, vol.74, p.597-608
10 (1993))、これらは細胞内に発現される必要があり細胞外に添加してもほとんど意味をなさない。それに対して、細胞外の因子としては、活性酸素によるアポトーシスを抑制するスーパーオキシサイドディスムターゼ(以下、SODと称することがある)(Greenlund L.J., et al., Neuron, vol.14, p.303-315 (1995))、カタラーゼ(Sandstrom P.A. and Buttke T.M., Proc Natl Acad Sci USA, vol.90,
15 p.4708-4712 (1993))、グルタチオンペルオキシダーゼ(Kayanoki Y., et al., J. Biochem, vol.119, p.817-822 (1996))等が報告されているが、これらだけで全ての細胞死を効果的に抑制することはできない。

細胞を培養する際、主として培養細胞自身由来もしくは添加物由来の物質による細胞に対するストレスが原因で細胞死が誘導されるが、同じ条件で全ての細胞
20 に対する細胞死が誘導されるわけではない。通常、そのような環境に適応する細胞には、ストレスによる細胞死誘導シグナルを閾値以下に保つために必要な蛋白質が、細胞内外にすでに発現されているか、新たに誘導されている筈である。それらの蛋白質としては転写因子、合成酵素、代謝酵素、酸化還元酵素、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、転移酵素、アポトーシス抑制蛋白等が考えられる。つまり、
25 個々の細胞でストレスに対する感受性に差が生じるのは、それらの蛋白質の発現量に差があるためであると予想される。そこで、細胞死の機序がそれぞれ異なるにせよ、あるストレスによる細胞死に対して抑制する因子を外から添加することにより、その細胞死誘導のシグナルを閾値以下に保つことが可能であれば、培養細胞の場合だけではなく、生体内でも同様のストレスが生じた場合に起こる

細胞死を抑制することが可能と考えられる。

また、細胞死と疾患には密接な関係が存在しているため、生体内の細胞死抑制効果を示す物質を数多く同定することにより多くの細胞死をコントロールすることができれば、疾患の治療等、医療への応用が実現できるばかりでなく、同様に、
5 培養細胞の効果的培養系への応用も可能となる。実際、前述のように細胞内の細胞死抑制因子として $bcl-2$ 、 $bcl-x$ 等が、細胞外の細胞死を抑制する因子としては活性酸素によるアポトーシスを抑制する SOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ等が存在するが、これらの因子を細胞外に添加することにより全ての細胞死が抑制されることは難しい。それは、その作用機序の差異により、細胞死の発生過程が異なるためである。そのことを考慮すれば、種々の細胞死に対して、有意に、そしてより特異的に細胞死を抑制する活性を同定する必要がある。つまり、既知の物質により抑制を受けない細胞死に対しては、細胞死を有意に抑制する物質を探索することが必要とされている。また、生体内の細胞死抑制物質は生体の恒常性を保つ働きを有する物質として存在している可能性は
10 高く、それらを同定する意味は大きい。

細胞の無血清培養時もしくは特殊な条件下での培養時には、培養時のストレスにより起こるアポトーシスが度々観察される。このような細胞死が誘導される条件で細胞培養を実施し、その細胞死を抑制する活性を指標に各種クロマトグラフィー手法を用いて血液中の有効成分を精製すれば、細胞死を抑制する蛋白質成分
20 を調製することができる。

発明の開示

種々の検討の結果、セレノプロテイン P の C 末端側 103 アミノ酸残基からなる配列又は当該アミノ酸配列のうち 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列又は前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列を有する、
25 ペプチド断片又は前記ペプチド断片を起源とする一連のペプチド断片群が、優れた細胞死抑制活性を有することが判明した。なお、本願発明でいうペプチド断片群とは、糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微細構造の異なるペプチド断片の集合体を意味する。

本願発明による特に好ましいペプチド断片群は、式 (I) :

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala
Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1) 及び/又は式
(I I):

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser
5 Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2)

(式中、Xaa はセレノシステインを表す)で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有するものである。

また、その精製過程における知見により、当該ペプチド断片又はペプチド断片群は(a)分子量分画膜に基づき10kDa～30kDaの分子量画分に回収され、
10 (b)イオン交換樹脂への結合性の検討の結果、血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造とpH8以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系SDS-PAGEでは分子量13～14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された16～17kDaの2本のバンドを示し、また(d)還元条件下でのSDS-PAGEでは、前記バンドに加えて3～4kDa、7～9kDa及び10～12
15 kDaのバンドを呈する性状を有すること、さらに断片化された前記ペプチドにも活性が存在することが明らかになった。

図面の簡単な説明

図1は、本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群の各種精製工程での、電気泳動図(銀染色、ウエスタンブロッティング)である。

20 図2は、本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片又はペプチド断片群の純度を示す電気泳動図(銀染色、ウエスタンブロッティング)である。

図3は、抗セレノプロテインP抗体結合担体カラムを用いて精製された本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片又はペプチド断片群の純度を示す電気泳動図(銀染色)である。

25 図4は、本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片又はペプチド断片群のN-グリコシダーゼ処理後の挙動を示す電気泳動図である。

図5は、本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片又はペプチド断片群の還元カルボキシメチル化後の挙動を示す電気泳動図(銀染色)である。

図6は、本願発明の細胞死抑制活性を有する精製ペプチド断片又はペプチド断

片群の還元カルボキシメチル化後の挙動を示す電気泳動図(ウェスタンブロッティング)である。

図7は、本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群とその他の蛋白質の、細胞死抑制活性に関する比較試験の結果を示す図である。

5 図8は、本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群と他の抗酸化剤の、細胞死抑制活性に関する比較試験の結果を示す図である。

図9は、脂肪酸により誘導される細胞死に対する本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群の細胞死抑制活性を示す図である。

10 図10は、脂肪酸により誘導される細胞死に対する本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群とビタミンEで代表される抗酸化剤の、細胞死抑制活性に関する比較試験の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

細胞死抑制活性を有する因子をスクリーニングするためには、細胞死を誘導する培養系を構築する必要がある。本願発明では、好適な一例としてアルブミン添加無血清培地を用いたヒト巨核芽球系のD a m i細胞の培養系をスクリーニング方法として用いた。D a m i細胞はRPMI 1640、D-MEM、F-12の1:2:2混合培地(0.1%BSA及び0.05 μ M2-メルカプトエタノール含)により継代可能であるが、アルブミン不含培地では殆ど増殖しない。このとき、培地中に0.01から0.5%のヒト血清アルブミンが存在する条件下において細胞は正常に増殖するが、4日目以降に全ての細胞が徐々にではなく突然死する。この培養系に活性画分の希釈試料を添加することにより細胞死抑制活性の大小を比較することが可能である。

25 アッセイにはD a m i細胞の利用が最も効果的であるが、特にこの細胞に限定されるものではなく、同様の条件で細胞死が生じるものであればどのような細胞を用いても細胞死抑制活性をスクリーニングすることは可能である。他にも適用可能な細胞としては、CEM、M o l t 4等の細胞が例示される。また、このアッセイ系に用いるアルブミンは細胞死を観察できるアルブミンならどのようなアルブミンでもよいが、例えばS I G M A社製のヒト血清アルブミンF-Vは好ましい態様の一つである。

上述のアッセイ系に基づいて、体内成分とりわけ血液由来の成分に着眼し、鋭意活性探索を検討した結果、本願発明者らはヒトを初めとする哺乳動物の血漿又は血清中に所望の活性を見出すに至った。検出された細胞死抑制活性画分は、ヒト血漿及び血清を原料とした場合では1600～3200倍希釈まで細胞死抑制活性を示し、牛胎児血清を原料とした場合では100倍希釈以下の活性を示した。本明細書では、細胞死抑制活性を定量化する際、希釈倍率100以下を0、それ以上の希釈倍率の値をそのまま活性値として表す。

本願発明により提供される活性物質であるペプチド断片群は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、広範な精製法を適用することが可能である。すなわち、種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を適宜組み合わせることにより、所望の細胞死抑制活性を分画することが可能である。その望ましい組み合わせの一例を実施例2に示す。態様の概略は、操作順に従って、ヘパリンクロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿分画、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー及び陰イオン交換クロマトグラフィーである。

この組み合わせにより、得られる活性画分は純度的に推定夾雑物5%以下、例えばヒト血漿を出発原料とした場合、 $2 \times 10^5 / 1 \text{ mg 蛋白質/ml}$ の活性を示す状態で精製することが可能である。出発原料の血漿の活性が約20～40/1 mg 蛋白質/ml程度であるので、比活性で推定5,000～10,000倍程度上昇する。

上述のごとく精製同定された本願発明の血漿中の細胞死抑制活性成分は、下記の性質によって特徴づけられる物質である。

ヘパリン結合性

ヘパリンカラムへの結合性を調べると、細胞死抑制活性成分は弱いヘパリン結合性を示す。この知見により、本願発明の細胞死抑制活性成分は相対的に正電荷を帯びている物質であり、血球、血管内皮等血中においてストレスに曝されやすい細胞表面のヘパラン硫酸と結合することにより細胞表面の保護に関与する物質であることが予想される。

分子量分画膜による活性の挙動

血漿中のヘパリン結合画分について、分画分子量10 kDa、30 kDa、50 kDaの膜により抑制活性を濃縮すると、分画分子量10 kDaで90～95%、30 kDaで10～20%、50 kDaで0～10%の活性が回収される。このことより、本願発明の細胞死抑制活性成分は、他のヘパリン結合蛋白が存在する条件下において、その80～90%は10 kDa～30 kDaの分子量を示すが、一部にはそれ以上の分子量を示すこともあることから、修飾、重合、プロセシングの差に起因する分子量の異なる活性物質が一部存在することも示唆される。

硫酸アンモニウム分画

粗分画の試料は2 M程度で全ての活性が沈殿する。ただし、厳密には、全ての活性を沈殿させるためには3 M程度の硫酸アンモニウムを添加する必要がある。本願発明の活性成分は、塩析操作により他の蛋白質と共沈することもあるが比較的塩析されにくい性質を示す。

イオン交換樹脂への結合性

20 mM程度の適当な緩衝液を用いた場合、pH 8.0以上で陰イオン交換体へ一部結合性を示すが、全ての活性が完全に結合することはない。また、pH 7.0以下で陽イオン交換体への結合性を示す。このことから、本願発明の活性成分は血中でpH 7からpH 8の間に等電点を示す構造と、pH 8以上に等電点を示す構造を有する物質であることが推察される。

疎水クロマトグラフィーによる分画

Macro-Prep Methyl HIC、Macro-Prep t-butyl HIC 担体を用いた場合、20 mM Tris (pH 8.0)、200 mM NaCl、1.2 M硫酸アンモニウム存在

下での活性画分の吸着はほとんど観察されない。1.5 Mまで硫酸アンモニウム濃度を高めると3～5割が吸着され、さらに2～2.4 Mまで硫酸アンモニウム濃度を高めるとほとんど全ての活性を吸着させることができる。異なる担体を用いた場合も、同様の条件により本願発明の活性成分を効果的に精製することが可能である。

ゲル濾過による分画

ヘパリン結合画分についてゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分画した場合、分子量が30 kDa～40 kDaのサイズに殆どの活性が回収されるが、実際に得られる本願発明の活性物質は電気泳動で明らかに30 kDa以下の分子量を示すことから、他の分子と結合しやすい可能性のある物質と予想される。

PAGE (ポリアクリドアミドゲル電気泳動)

本願発明の活性物質を未変性PAGEにより分画すると活性が単一のバンドに収束しないことから、活性物質は単一の構造ではなく、2量体の形成、荷電の違い、糖鎖の付加又は本願発明の活性物質を構成するペプチド断片の断片化の形態の相違等により多様な分子量の状態が存在していることが示唆される。SDS-PAGEでは、非還元状態での電気泳動において、分子量約13～14 kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された約16～17 kDaの2本のバンドを示すペプチドにより構成されていることを確認することができる。また、還元条件では、それらに加えて約3～4 kDa、約7～9 kDa及び約10～12 kDaのバンドが出現することから、内部にS-S結合を持つ約13～14 kDa及び約16～17 kDaのバンドに相当するペプチドの一部に内部切断が生じているものが存在し、還元によりS-S結合が切断され、前述の新たなサイズのペプチドが出現することを示している。このことは、約3～4 kDaのペプチド断片に対する抗体が約7～9 kDa及び約10～12 kDaのペプチド断片以外の全てのペプチド断片と反応することからも支持される。また、還元状態で得られる約3～4 kDaのペプチド自体にも細胞死抑制活性が存在することより、このペプチド部位が最も活性に関係する領域である可能性は高い。

N末端アミノ酸配列分析

上記PAGEで確認されたペプチド断片は、ヒトセレノプロテインPのcDN

Aから推定されるアミノ酸配列中のC末端側103アミノ酸残基部分と高い相同性を示す物質であることが明らかになった。

N末端アミノ酸配列分析の結果、本願発明の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又は当該ペプチド断片と起源を同じくするペプチド断片群は、①ヒト・セレノプロテインPの260位のLysより始まる、Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1)の配列、及び②ヒトセレノプロテインPの293位のトレオニンより始まる Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Lys Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Cys Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2) (Xaa はセレノシステインである)の配列を含むペプチドを基本ユニットとしていることが判明した。本願発明の活性物質は、構成ユニットとしての前記ペプチド断片の結合体又は複合体として存在し細胞死抑制活性を発揮する。一方、構成ユニットの各々にも活性が認められる。さらに、糖鎖の付加の相違、荷電の違い、また断片化の形態の相違、とりわけペプチド断片のC末端側の多様性等により多様な分子種が混在しており、混在状態においても本願発明の細胞死抑制活性を呈する。従って、本願発明の活性物質には、細胞死抑制活性を呈する限りにおいて、活性を有する個々のペプチド断片及びその部分断片のみならず、多様なペプチド断片の集合体、即ちペプチド断片群が包含される。

ところで、これまでセレノプロテインPには本願発明で特徴づけられるサイズを有するプロセスされたフォームが存在するという報告はなされておらず、ましてこの部位のみで活性を持つことを示唆する報告もなされていない。

セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ (glutathione-peroxidase)とは異なるセレン含有タンパク質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン(selenocysteine)の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該蛋白質は最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された(Hill K.E. 及び Burk R.F., Biomed. Environ. Sci., 10, p.198-208 (1997))。しかし、実際には、組換え蛋白の発現や、精製セレノプロテインPにおける本願発明中の活性ペ

5 プチド断片又は活性ペプチド断片群に相当するアミノ酸配列の同定等はなされておらず、活性部位の同定もなされていない。また、抗セレノプロテインP抗体を用いてヒトセレノプロテインPを精製したという報告もあるが、用いられた抗体がセレノプロテインPのN末端側を認識する抗体に相当するため、今回得られたペプチド断片のみの精製も不可能である。よって、本願発明で特徴づけられる活性ペプチド断片又は活性ペプチド断片群についての活性評価を行なったのは、本願が最初である。

10 セレノプロテインPの活性としては、セレンに由来する抗酸化活性、グルタチオンペルオキシダーゼ活性が報告されているが、現在までに、本願発明により得られたペプチド断片又はペプチド断片群が生体に存在し優れた活性を示すという報告はなく、当然、本願発明中に特徴づけられる活性の存在も報告されていない。

その他の蛋白との活性比較

15 本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片又はペプチド断片群以外のセレノ蛋白及び抗酸化関連蛋白について、D a m i 細胞の細胞死抑制活性の有無を相対比較すると、グルタチオンペルオキシダーゼ、S O Dには若干の活性が観察される。しかし、本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片又はペプチド断片群と比較した場合、これらは1/100以下の活性しか示さず、この活性は殆ど無いに等しい値である。また、本願発明の活性物質に関連性の高い完全長のセレノプロテインPとの比較では、断片化された本願発明の活性物質の細胞死抑制活20 性に関する顕著な優位性が認められ、「断片化」の意義の重要性が如実に示される。つまり、本願発明の活性物質は、本願発明により特徴づけられる明らかな細胞死抑制活性を示す蛋白質としては知り得る限り唯一の血中成分であり、この存在を明らかにしたことに大きな意義が存在する。

25 なお、上述の知見に基づき本願発明により得られたペプチド断片をリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

前述の本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片を免疫原として用いることにより、このような新規なペプチドを認識し結合する抗体を得ることができる。本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群を含むものであれば免疫原としての能力を有するが、実施例2で調製した画分を使用するのが望ましい。また、ペプ

チド合成機を用いる方法あるいは遺伝子組換え技術により大腸菌、酵母等の微生物に産生させる方法等を用いて、本願発明のペプチド断片、又はその一部に相当するペプチドを得、免疫原とすることもできる。さらに、本願発明のペプチド断片もしくはその一部をコードする遺伝子を組み込んだ動物細胞用の発現プラスミドもDNAワクチンとしての免疫原として使用可能である。

5 そのようなペプチド断片の望ましいアミノ酸配列として、Lys Arg Cys Ile
Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa
Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa
Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu
10 Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile
Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln
Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn (Xaa はセレノシステインである) (配列
番号3) あるいは Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp
Ser Glu Leu Ala Pro Arg (配列番号4) が挙げられるが、これに限定されるも
15 のではない。

免疫する哺乳動物は限定されるものではないが、抗血清を得る場合にはウサギ等が望ましく、後に述べるモノクローン抗体を細胞融合等で得る場合にはマウスが望ましい。動物の週齢は、例えばマウスでは5～10週齢がよい。性は雌雄どちらでもよい。免疫用抗原は、例えば適当なアジュバントに懸濁させるか、又は
20 生理食塩水等に溶解して、動物の腹腔内、皮下、静脈内等に投与するのが好ましい。この免疫操作を2～3週間隔で1～5回行なう。最終免疫は、例えば免疫用抗原を生理食塩水に懸濁させ、動物の静脈内に投与する。このような免疫動物から採血し抗血清を調製するか、あるいは脾臓細胞を調製し、Kohler G. と
Milstein Cの方法(Nature, vol. 256, p. 495(1975))に基づいて、抗体を産生する
25 ハイブリドーマを得ることができる。例えばマウスの場合、免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とを細胞融合してハイブリドーマを得る。

ハイブリドーマを培養する培地としては、ハイブリドーマの培養に適した培地であればよく、一般的には、RPMI 1640培地又はEagleのMEM培地に、牛胎児血清(5～10%)、L-グルタミン(3.5～4.0 g/l)及び抗生

物質(ペニシリンGやストレプトマイシン等)を添加したものが用いられる。また、ASF104(味の素社製)、CM-B(三光純薬)等の無血清培地を用いることもできる。得られたハイブリドーマの中から、本願発明ペプチドに特異的なモノクローン抗体を産生するもののみをスクリーニングする。スクリーニングは、例えば、ハイブリドーマの培養上清を一部採取し、それが本願発明ペプチド断片又はその一部分に相当するペプチドと反応するかどうかを、EIA法あるいはRIA法、ウェスタンブロット法等の公知の方法で調べることが可能である。この方法は免疫動物の抗体の力価が上昇しているかどうかを知る方法としても使用できる。

産業上の利用可能性

一般的に、何らかのストレス(例えば、止血状態、炎症の発生、臓器障害、細胞の損傷、血管の損傷、細菌感染、ウイルス感染など)が生じると遊離の脂肪酸量が3倍以上も増加し細胞毒性が出現すると報告されている(「脂質の化学」、p.170-179、中村治雄編 朝倉書店(1990年)；「脳卒中実験ハンドブック」、p.437-471、佐野圭司監修 アイピーシー(1990年))。この知見からも、ストレス状態が維持される環境では、種々の細胞の感受性の差があるにせよ、脂肪酸による細胞への悪影響が出現すると予想される。つまり、手術時のストレス(出血、止血、虚血)、疾患や臓器移植などに伴う虚血後の再灌流のストレス、持続的な炎症によるストレスなどに対して、本願発明のセレノプロテインPに由来する活性ペプチド断片又はペプチド断片群が細胞の抗酸化能を上げることにより細胞への悪影響を低減させ、病態悪化を防ぐことができる。また、同様の機序で細胞内の酸化ストレスを上昇させる現象に対して、当該活性ペプチド断片又はペプチド断片群は細胞内の抗酸化能を上昇させることにより細胞を安定化する働きが期待できる。

本願発明中の活性ペプチド断片又はペプチド断片群は生体内においてプロセスされた活性フォームとして血中で機能しており、ストレス由来により起きる細胞死を防御し、細胞の安定維持に働いていると予想される。つまり、過剰のストレスを防御しきれない場合などには細胞死が生じるはずであるから、このような時、本願発明の活性ペプチド断片又はペプチド断片群を外部から補給することが可能であれば、重篤な疾患への移行を未然に防ぐことも可能であるし、治療につなげ

ることができる。本願発明の活性ペプチド断片又は活性ペプチド断片群が予防ないし治療可能な疾患として、具体的には、酸化ストレスに起因して影響を受ける疾患、例えば、AIDS（後天性免疫不全症候群）、パーキンソン病、アルツハイマー病等が挙げられる。また、動脈硬化の原因因子として酸化LDLが関与していることから、動脈硬化の病態悪化の阻止、治療、予防等への使用も考えられる。あるいは心筋梗塞、脳梗塞や臓器移植等再灌流傷害が観察される疾病にも有効である。

とりわけAIDSに対しては、セレン蛋白とAIDSやHIV（ヒト免疫不全ウイルス）との間に密接な関連があることが、近年、報告されている。すなわち、HIV感染に伴って血清中のセレン濃度が低下し、その際、セレン濃度の低下とCD4細胞数の低下や mortality とに相関があるとの報告がある（Olmsted L. et al., Biol. Trace Elem. Res., vol.20, p.59-65, 1989; Allard J.P. et al., Am. J. Clin. Nutr., vol.67, p.143-147, 1998）。また、HIVの核酸配列にはフレームシフトさせるとセレン蛋白を合成できる配列が存在しており、実際、HIVを感染させたTリンパ球腫は、本来合成すべきセレン蛋白（グルタチオンペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素）を合成できなくなることが報告されている（Taylor E.W. et al., Biol. Trace Elem. Res., vol.56, p.63-91, 1997; Gladyshev V.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.96, p.835-839, 1999）。さらに、AIDSにおけるTリンパ球の細胞死における酸化ストレスの関与が示唆されている（Romero-Alvira D. et al., Med. Hypotheses, vol.51, p.169-173, 1998）。

実際、セレン定量の結果、AIDS患者は血中セレン濃度が正常人と比較して半分程度しか存在していないことがわかっている。この際にAIDS患者の血中セレノプロテインP濃度も正常人と比較して異なる可能性があるため、EIAの測定系を用いてAIDS患者の血漿中のセレノプロテインP量を測定したところ、早く病態が悪化した患者より病態の進行の遅い患者及び発症しない患者の方がセレノプロテインPの量が多い傾向のあることが観察された。また、AIDS患者と健常人血漿中のセレノプロテインPの状態を比較するために抗セレノプロテインP抗体固定化担体を用いた免疫沈降を試みたところ、患者の病態の進行の遅い

グループ及び発症しないグループは健常人と類似のパターンを示したのに対し、早く病態の悪化した患者のグループは健常人と明らかに異なるパターンを示す傾向にあることを確認した。これらの結果より、セレノプロテインPはAIDSの症状改善、発症予防に有用である可能性が示唆された。

5 このように、血中セレン濃度、とりわけセレノプロテインP濃度とAIDSとの関連が示唆されているが、セレノプロテインPの特定の配列を有するC末端側部分断片がセレノプロテインP自体と比較して有意に高い細胞死抑制活性を有し、それゆえAIDSの予防・治療に有用であることについては、これまで全く知られていなかった。

10 その他にも、B細胞及びT細胞系の培養においても、この活性ペプチド断片又はペプチド断片群が有効に働いていることは明らかであるから、免疫細胞系の安定化、制御等を行なうことによる、免疫促進、制御薬等への応用も可能である。また、培養細胞においても過剰のストレス由来の細胞死を防ぐことにより、有用な生体物質を産生させる場合などにおける培養条件の効率化などに利用可能である。

15 本願発明のペプチド断片又はその一部からなるペプチド並びに当該ペプチド断片との結合能を有する抗体は、ウエスタンブロット法、ELISA法等の抗原検出系に利用することができ、診断薬を構築する材料となる。また、上記の抗体を適当な担体に結合させ、これを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、
20 本願発明の活性を有するペプチド断片を精製することができる。さらに、B細胞及びT細胞系の培養においてもこの活性ペプチド断片が有効に働いていることは明らかであり、加えて本願発明の活性ペプチド断片の免疫時の知見による、免疫原としての活性ペプチド断片に対する抗体がB細胞に影響を与えている、との示唆を勘案すれば、免疫細胞系の安定化、制御等を行なうことによる、本願発明の
25 抗体の免疫促進、制御薬等への応用も可能である。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明する。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡及び New England BioLabs 社製の試薬を使用した。

実施例 1

(アッセイ法)

0.05 μ M 2ME及び0.1%BSAを含有する無血清培地SFO3(三光純薬社製)で継代可能なDami細胞(Greenberg S.M., et al., Blood vol. 72, p. 1968-1977 (1988) に記載: 1×10^6 細胞/dish/3ml) 1mlにRPM I 1640/D-MEM/F-12の1:2:2混合培地(SA培地)を2ml添加後、3日間培養し、アッセイ時に当該細胞を回収した。細胞を50%PBS/SA/0.03%HSA(SIGMA社製)により2回洗浄し、同培地で 3×10^4 細胞/mlになるように懸濁後、得られた細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ200 μ l、段階希釈のためのウェルには100 μ lずつを96wellプレートに分注した。サンプル添加ウェルにアッセイ試料を2 μ l添加し搅拌後、100 μ l細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。37℃のCO₂インキュベーターで4~5日間培養し判定した。

アッセイの評価法としては培養4日目以降、活性のないwellの細胞は死滅し活性のあるwellの細胞は生存し続けることから、生細胞が被検試料の何倍希釈まで存在するかで評価した。

実施例 2

(細胞死抑制活性成分の精製)

以下の精製工程における活性の追跡は、すべて実施例1に記載のアッセイ法に拠った。

血漿中の細胞死抑制活性はヘパリン結合性を示す。そこで、先ず、血漿中のヘパリン結合画分を集めるためにヘパリンカラムを用いた分画を行なった。ヒト血漿を出発原料とし、血漿中のヘパリン結合蛋白をヘパリンカラム(Heparin Sepharose: Pharmacia 社製)に吸着させた後、0.3M塩化ナトリウムで洗浄後、2M塩化ナトリウムにより吸着画分を溶出した。目的の細胞死抑制活性の殆どは0.3M塩化ナトリウム洗浄画分に回収されるが、活性物質の精製には2M塩化ナトリウム溶出画分を用いた。

ヘパリンに結合した細胞死抑制活性の粗分画を実施するために、硫酸アンモニウム沈殿による分画を行なった。2M塩化ナトリウムヘパリン溶出画分の総量に

対して 31.3%W/V (約 2M) の硫酸アンモニウムを添加し、沈殿物を回収した。沈殿物を水に溶解し、分子量 3,500 カットの透析膜を用いて水に対して透析した。透析の完了した溶液を回収後、その総量に対して 1/50 量の 1M T r i s 塩酸緩衝液 (pH 8.0) を添加し、さらに、20mM T r i s 塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用いて OD 280 の値で 20~30 になるように溶液濃度を調整した。この溶液から不溶物質を除去するため、1.0 μ m 及び 0.45 μ m の濾過フィルターを用いて濾過した。

20mM T r i s 塩酸緩衝液 (pH 8.0) により平衡化した陰イオン交換クロマトグラフィー担体 (Macro-prep High Q: BioRad 社製) に、濾過済みの蛋白溶液を通液し、陰イオン交換クロマトグラフィーを実施した。この時、非吸着画分及び 50mM 塩化ナトリウム溶出画分に活性が存在していたため、この画分を回収し混合した。陰イオン交換クロマトグラフィーにより得られた活性画分に対して、1M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) と 1M クエン酸を 6:4 の割合で混合した溶液を総量の 1/50 量添加し、20mM クエン酸緩衝液 (pH 約 4.0) となるように蛋白溶液を調製した。

20mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) により平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー担体 (Macro-prep High S: BioRad 社製) に、前述の蛋白溶液を通液し、陽イオン交換クロマトグラフィーを実施した。220mM 塩化ナトリウムを含む 20mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で洗浄後、550mM 塩化ナトリウムを含む 20mM クエン酸緩衝液 (pH 4.0) により溶出される画分に活性が存在したため、この画分を回収した。

得られた 550mM 塩化ナトリウム溶出画分の総量に対して 1M T r i s アミノメタン溶液を 1/30 量添加し、pH を約 7.5 に調整した。この溶液に対して 3.5M 硫酸アンモニウム溶液 (1M T r i s 塩酸緩衝液 (pH 8.5) を 1/50 量添加し pH を約 7.5 に調整) を 2/3 量添加後、硫酸アンモニウム濃度が 1.4M、塩化ナトリウム濃度が 330mM になるように塩濃度を調整した。さらに、不溶物質を除去するために、0.45 μ m の濾過フィルターを用いて濾過した。

次に 1.4M 硫酸アンモニウム及び 330mM 塩化ナトリウムを含む 20mM T r i s 塩酸緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した疎水クロマトグラフィー担体

(Macro-prep Methyl HIC: BioRad 社製)に前述の濾過済み蛋白溶液を通液し、疎水クロマトグラフィーを実施した。非吸着画分及び平衡化緩衝液(pH 7.5)洗浄画分に活性が存在したため、この画分を回収した。吸着画分には殆ど活性は存在しなかった。活性画分を疎水クロマトグラフィー担体に結合させるために、活性画分に対して硫酸アンモニウム濃度が2.0Mになるように上記の約pH 7.5の3.5M硫酸アンモニウム溶液を添加した。2.0M硫酸アンモニウム及び240mM塩化ナトリウムを含む20mM Tris 塩酸緩衝液(pH 7.5)により平衡化した疎水クロマトグラフィー担体(Macro-prep Methyl HIC: BioRad 社製)に試料を通液し、活性成分を吸着させた。平衡化緩衝液により洗浄後、吸着している活性を20mM Tris 塩酸緩衝液(pH 8.0)により溶出した。回収した活性画分を水に対して1昼夜透析し、この回収した活性画分をヘパリンカラムに確実に吸着させるために、1Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)を1/50量添加し、pHを約5.0に調整した。以上、図1参照のこと。

20mMリン酸緩衝液(pH 6.5)(緩衝液A)及び2M塩化ナトリウムを含む20mMリン酸緩衝液(pH 6.2)(緩衝液B)を調製し、緩衝液Aで平衡化したヘパリンカラム(Hi-Trap Heparin: Pharmacia 社製)にpH調整した活性画分を通液した。その後、緩衝液Bを緩衝液Aに対して5%混合した溶液(0.1M NaCl)によりカラムの2倍量洗浄した後、さらに、緩衝液Bの緩衝液Aに対して20%混合した溶液(0.4M NaCl)により溶出し、活性画分を回収した。ここで得られた活性画分を15mg/ml程度の濃度まで膜濃縮器(Centriprep 3: Amicon 社製)により濃縮した。濃縮した活性画分の総量に対して2%の酢酸を添加後、0.45μmの濾過フィルターにより不溶物の除去を行なった。

2%酢酸及び500mM塩化ナトリウムを含む溶液により平衡化したゲル濾過クロマトグラフィー担体(Superdex 200pg: Pharmacia 社製)に活性画分を1ml通液し、ゲル濾過クロマトグラフィーを実施し、活性を分画後、回収した。

0.1%トリフルオロ酢酸及び1%イソプロパノールを含む1%アセトニトリルにより平衡化したC4逆相HPLC(Wakosil 5C4-200 6mm×150mm: 和光純薬社製)に前述の画分を通液し、平衡化溶媒で洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸及び1%イソプロパノールを含む条件下で1%から40%アセトニトリル

のリニアグラジエント溶出により得られた活性画分を回収した。ここまでの各精製工程における活性及び比活性の推移を表 1 にまとめる。

表 1

	精製工程	蛋白濃度 (mg/ml)	活性	比活性
5	①原料血漿	6 4	2 4 0 0	3 8
	②ヘパリン溶出／硫酸アンモニウム処理	2 2. 6	1 2 8 0 0	5 6 6
	③陰イオン交換クロマト、素通り画分	2. 1	4 8 0 0	2 2 8 6
	④陰イオン交換クロマト、吸着・溶出	0. 4	1 6 0 0	4 0 0 0
	⑤陽イオン交換クロマト、吸着・溶出	2. 8	1 2 8 0 0	4 5 7 1
10	⑥疎水クロマト、吸着・溶出	6. 8	2 5 6 0 0	3 7 6 5
	⑦HiTrapヘパリン、吸着・溶出	1. 6	2 5 6 0 0	1 6 0 0 0
	⑧C 4 逆相HPLC	0. 9	2 0 4 8 0 0	2 2 7 5 5 6

得られた活性画分をさらに細かく分画するためにイオン交換クロマトグラフィー担体Mini Q (Pharmacia 社製) による分画を実施した。20 mMエタノールアミン (pH 9.15) の条件下で塩化ナトリウムによるリニアグラジエント溶出を行なった。分画された画分には全て活性が存在しており、全ての画分が後述の実施例 4 で得られた抗体と反応した。つまり活性物質はいくつかの構造の異なる状態で存在していることが確認された。

この段階での目的の活性物質は、電気泳動による解析の結果、非還元状態で 10 kDa から 30 kDa の数本のバンドより構成され、還元状態では 3～4 kDa と 7～9 kDa にスミアなバンドが 1 本、13～14 kDa に 2 本、16～17 kDa に 2 本の最低 6 本のバンドを示した。これらのバンドは全て実施例 4 に示す抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出可能であった。非還元状態での電気泳動において、28～29 kDa 近傍にも抗体に反応する蛋白が確認されることより、2 量体を形成しているものも存在している可能性が示唆された。図 2 参照のこと。

実施例 3

(活性成分の N 末端配列解析)

気相シーケンサーによるアミノ酸配列解析の結果、本願発明の活性画分は、

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala
Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1) の配列及び Thr
Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa
Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2) (Xaa はセレノシステイン
5 である)の配列を含むペプチドより構成されていた。この画分のシーケンス解
析時のアミノ酸回収量より予想されるそれぞれの存在比は1 : 1から2 : 1の範
囲であった。また、この2種のペプチド以外の蛋白由来のアミノ酸の回収は5%
以下であった。この2種のペプチドは還元状態でのゲル濾過クロマトグラフィー
及びC4逆相HPLCにより分離されるため、S-Sにより結合しているものが
10 存在することが予想された。

還元状態でのC4HPLCにより分離されたペプチドの中で3~4kDaの分
子量を示すペプチドはシーケンス解析の結果、Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu
Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser (配列番号5) の
配列を示し、7~9kDaが大部分を占める画分は、Thr Gly Ser Ala Ile Thr
15 Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala
Glu Glu Asn Ile (配列番号2) の配列を示した。また、13~14kDa、1
6~17kDaの画分も Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro
Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser (配列番号5) の配列を示した。これら
の得られたアミノ酸配列は、下記表2に示す公表されているヒト・セレノプロテ
20 インPのcDNA配列(Hill K.E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
vol. 90, p. 537-541 (1993))より推測されるアミノ酸配列のシグナル以降260
番目のリジンより始まる断片と293番目のトレオニンより始まる断片に相当す
ることが推察された。

表 2

Met Trp Arg Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Cys Leu Leu Pro
 Ser Gly Gly Thr (シグナル配列)
 Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro Pro Ala Trp 15
 5 Ser Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly Ser Val 30
 Thr Val Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser Xaa Tyr Leu Cys Ile Ile 45
 Glu Ala Ser Lys Leu Glu Asp Leu Arg Val Lys Leu Lys Lys Glu 60
 Gly Tyr Ser Asn Ile Ser Tyr Ile Val Val Asn His Gln Gly Ile 75
 Ser Ser Arg Leu Lys Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Ser Glu 90
 10 His Ile Pro Val Tyr Gln Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp 105
 Thr Leu Leu Asn Gly Ser Lys Asp Asp Phe Leu Ile Tyr Asp Arg 120
 Cys Gly Arg Leu Val Tyr His Leu Gly Leu Pro Phe Ser Phe Leu 135
 Thr Phe Pro Tyr Val Glu Glu Ala Ile Lys Ile Ala Tyr Cys Glu 150
 Lys Lys Cys Gly Asn Cys Ser Leu Thr Thr Leu Lys Asp Glu Asp 165
 15 Phe Cys Lys Arg Val Ser Leu Ala Thr Val Asp Lys Thr Val Glu 180
 Thr Pro Ser Pro His Tyr His His Glu His His His Asn His Gly 195
 His Gln His Leu Gly Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Gln Gln Pro 210
 Gly Ala Pro Asn Ala Pro Thr His Pro Ala Pro Pro Gly Leu His 225
 His His His Lys His Lys Gly Gln His Arg Gln Gly His Pro Glu 240
 20 Asn Arg Asp Met Pro Ala Ser Glu Asp Leu Gln Asp Leu Gln Lys 255
 Lys Leu Cys Arg Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu 270
 Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys 285
 Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln 300
 Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg 315
 25 Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro 330
 Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser 345
 Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro 360
 Ser Asn

(Xaa はセレノシステイン) (配列番号 6)

実施例 4

(活性成分に対する抗体の作製)

実施例 2 で示された物質が、同一の物質由来のバンドであることを明らかにするために、以下に示すようにポリクローナルペプチド抗体及びモノクローン抗体を作製した。これらの抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果、電気泳動で観られる全てのバンドが同一のモノクローン抗体及びペプチド抗体により認識されることから、均一の構造ではないが全て同一の構造を持つペプチド断片であることを確認した。

①ペプチド抗体の調製

ペプチド抗体については、還元条件下で活性画分のゲル濾過及びC 4 逆相HPLCを実施することにより3~4 kDa のペプチドを分取し、そのアミノ酸配列解析の結果に従って20アミノ酸を合成し、ウサギに免疫することにより抗体を得た。詳細には、先ず、NH₂-Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg-COOH (配列番号4) のペプチドをペプチド合成機により合成し、C 18 逆相HPLCにより精製した。精製したペプチドをグルタルアルデヒド法によりKLHと1:1で結合し、その200 μgをニュージーランドホワイトウサギ2匹に接種した。初免疫感作は背部皮下経路でフロイント完全アジュバント存在下1回接種し、さらに2週間毎にフロイント不完全アジュバント存在下、背部皮下経路で3回追加免疫を行ない採血した。抗血清のEIAによる免疫原との反応性は、40,000倍まで抗体価の上昇がみられた。この抗血清を出発材料としてアガロースに抗原を結合させた担体によるアフィニティー精製を行なった。得られた抗体は抗血清と同様の反応性を示した。

②モノクローン抗体の作製

Balb/cマウスに、初免疫感作として腹腔内経路でフロイント完全アジュバント存在下で実施例2に記載の本願発明活性成分の精製画分50 μgを1回接種した後、2週間毎に腹腔内経路でフロイント不完全アジュバント存在下で2回免疫した。その1週後に静脈内経路で当該精製画分を50 μg接種した。最終免疫から3日後に、常法に従いマウスより脾臓細胞を採取した。マウス5匹のうち、

抗血清を用いたウエスタンブロットにより免疫原と反応の強かった2匹の脾臓細胞は、通常の細胞数の1/10と極端に少なく、免疫原に対する抗体がB細胞に影響を与えていることが予想された。この得られた細胞をミエローマ細胞P3X63Ag8U.1(P3U1)(ATCC寄託番号CRL-1597: Curr. Top. Microbiol. Immunol., vol. 81, p. 1 (1978))と細胞数1対1~2の割合で混合し、遠心処理(1,500rpm、5分)して上清を除き、沈殿した細胞塊を充分ほぐした後、予め37℃に加温しておいた1mlのポリエチレングリコール溶液(45%ポリエチレングリコール4000、55% RPMI 培地)を攪拌しながら加えた。37℃で5分間インキュベートした後、液の全量が50mlとなるようにゆっくりとRPMI 培地を加えた。遠心分離(1,300rpm、7分)後、上清を除去して緩やかに細胞をほぐした。これにエスロンCM-B培地(三光純薬社製)50mlを加え、メスピペットを用いて緩やかに細胞を懸濁した。この細胞懸濁液を4~5枚の96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに100μlずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。翌日に、HAT培地(エスロンCM-B培地にヒポキサンチン 1×10^{-4} M、チミジン 1.5×10^{-3} M、アミノプテリン 4×10^{-7} Mになるよう添加したもの)を各ウェルに100μlずつ分注し、5%炭酸ガスを含む37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。ハイブリドーマのコロニーが十分生育したものからHT培地(上記HAT培地からアミノプテリンを除いたもの)に交換し、培養上清の一部を分取し、以下に述べるスクリーニング法にて目的のハイブリドーマを選別した。

目的のハイブリドーマの選別は下記のEIA法、ウエスタンブロッティング法を組み合わせ実施した。

(1) EIA法

96穴のマイクロテストプレートに前記のごとく作製した合成ペプチド抗原、もしくは精製抗原(蛋白質濃度2μg/ml)を50μl/穴に加え、4℃で一晩インキュベートすることにより固相化した。さらに、1%BSA(ウシ血清アルブミン)溶液300μlを加え、同様にインキュベートしてマスキングを行なった。このようにして作製した抗原固相化プレートに細胞融合法によって得られたハイ

ブリドーマ及びクローニング後のハイブリドーマの培養上清を加えて、4℃で1.5時間インキュベート後、PBSで3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス免疫グロブリン抗体溶液(カッセル社製、5,000倍希釈)を100 μ l/穴加えた。4℃で1時間インキュベート後、PBSにて5回洗浄し、その後TMB Z基
5 質溶液を加え、常法により発色させその吸光度を波長450nmにて測定した。こうして精製抗原と反応するハイブリドーマクローンを選択した。この方法により、ハイブリドーマ約500個から陽性コロニーとして16個を選択した。

(2) ウェスタン・ブロッティング法

EIAで得られた陽性コロニーについてウェスタンブロッティング法によるスクリーニングを行なった。精製抗原を17.5%のSDS-ポリアクリルアミド
10 ゲルを用いて電気泳動し、PVDF膜上に移行させ、膜を0.4~0.5cm幅に切断した。各細片をハイブリドーマ培養上清液に浸し、1時間37℃でインキュベートした。その後、細片をTBST(0.05%Tween含)で3回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG(TAGO社製)の1:200
15 0希釈液中で37℃、1時間インキュベートした。TBSTで3回洗浄後、BCIP/NBTを用いる発色試薬(Bio-Rad社製)で発色させ、精製抗原の発色バンドを示すハイブリドーマを選択しクローニングした。クローニング後のハイブリドーマクローンについても同様の手法で選別した。上記の選別方法によって所望のモノクローン抗体を産生するハイブリドーマが2クローン得られた。

20 実施例5

(抗セレノプロテインP抗体結合担体カラムを用いたセレノプロテインP断片の精製)

血漿中のヘパリンセファロース結合画分を2M硫酸アンモニウムにより沈殿させ、その沈殿画分に対して5倍容量以上の20mM Tris緩衝液(pH8.0)
25 を用いて沈殿を溶解させた。この溶液に存在するセレノプロテインPを前記実施例4に記載の抗セレノプロテインP抗体を担体に結合させた抗セレノプロテインP抗体結合担体カラムに吸着させ、リン酸化生理食塩水(PBS)で洗浄した。その後、4M尿素を含有する20mMクエン酸緩衝液(pH4.0)によりセレノプロテインPを溶出し、当該溶出液をさらに20mMクエン酸緩衝液(pH4.

0) で平衡化した陽イオン交換体 (Macrorep High S、BioRad 社) に吸着させた。これを、塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出し、細胞死抑制活性を示すセレノプロテインP断片画分を回収した。このとき、全長のセレノプロテインPを得ることが可能であるが、この物質は蛋白質当たりの細胞死抑制活性は明らかに弱い値を示した。本方法によれば、短時間の精製が可能であるため、蛋白質当たりの細胞死抑制活性の強いセレノプロテインP断片を得ることができた。ここで得られた断片もまた、糖鎖の有無、分子間結合の有無、内部切断の有無などにより種々の大きさの分子種を含む混合画分であり、非還元電気泳動で10～30 kDaのサイズを示すセレノプロテインP断片群であった。図3参照のこと。

10 実施例 6

(mini Q活性画分のN-グリコシダーゼの処理)

活性画分の糖鎖結合の有無を確認するため、mini Qにより分画された活性フラクションについてN-グリコシダーゼFによるN型糖鎖の切断を行なった。反応は150 mM Tris (pH 7.4) 中で実施した。その結果、明らかに、16～17 kDaの2本のペプチドが13～14 kDaのサイズにシフトすることを確認した。他のペプチドには大きな変化は観察されなかった。図4参照のこと。

実施例 7

(還元カルボキシメチル化)

さらに、詳細な情報を得るために、本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群について還元カルボキシメチル化処理後の逆相C4 HPLCによる分離を行ない、得られたペプチドについての電気泳動及びアミノ酸配列解析を実施した。電気泳動の結果、未処理の状態では7～9 kDaと予想される2本のペプチドが還元カルボキシメチル化による影響で12～14 kDaに相当する移動距離に変化したF3のペプチド断片及び未処理の状態で10～12 kDaの分子量を示すと予想されるF2の16～18 kDaの2本のペプチド断片だけが Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg (配列番号4) の配列よりなるペプチド断片を含んでいないことをペプチド抗体との反応性から確認した。

アミノ酸配列解析の結果、F2及びF3の画分に含まれる前記のペプチド断片

は Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys
Ser Xaa Gln (配列番号 7) (Xaa はセレノシステイン) の配列を示し、N-グリ
カナナーゼ処理により F 2 の 16~18 kDa のバンドが F 3 のバンドにシフトし
ていることより、F 2 が F 3 のフラグメントに糖鎖が付加したものであることを
5 確認した。また、N-グリカナナーゼ処理により分子量がシフトするペプチドの存
在する画分を含めペプチド抗体で反応が観られる画分は全て Lys Arg Cys Ile
Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser (配
列番号 5) の配列を示した。

実施例 3 の結果及び上述の結果を勘案すれば、活性物質の① 3~4 kDa、②
10 7~9 kDa、③ 10~12 kDa、④ 13~14 kDa、⑤ 16~17 kDa
のバンドに相当する各ペプチド断片の中で、①、④及び⑤は 260 番目のリジン
より始まる断片、②及び③は 293 番目のトレオニンより始まる断片であること
が理解される。また、非還元条件では①、②及び③のペプチド断片は得られない
ことから、これらのペプチド断片は、元来 S-S により結合しているユニット構
15 造を有する④又は⑤のペプチド断片が内部切断されて生じたものであることが確
認された。⑤については N-グリカナナーゼ処理により④のサイズにシフトするこ
と、加えて①に対する抗体により認識されることより、④に糖鎖が付加したもの
であることが確認された。その他、糖鎖の付加によらないサイズの異なるバンド
20 がそれぞれのサイズ近傍に確認されることから、C 末端側の長さの異なるペプチ
ドが数種存在することが推察された。図 5 及び図 6 参照のこと。

実施例 8

(他の蛋白質との活性比較)

本願発明の活性成分に属さないその他のセレノ蛋白及び抗酸化関連蛋白質の細
胞死抑制活性の有無について検討した。相対比較するため、抗酸化関連セレノ蛋
25 白としてグルタチオンペルオキシダーゼ (SIGMA 社製)、その他の抗酸化関連
蛋白としてグルタチオンレダクターゼ (オリエンタル酵母社製)、グルタチオン S
トランスフェラーゼ (SIGMA 社製)、スーパーオキシドディスムターゼ (生
化学工業社製) を用いて、Dam i 細胞の細胞死抑制活性の有無を検討した。活
性測定試料としては 70 μ M 相当を等量用いた。アッセイの結果、グルタチオン

ペルオキシダーゼ、スーパーオキシサイドディスムターゼには若干の活性が観察されたが、これらは本願発明に特徴づけられる細胞死抑制活性を示すペプチド断片又はペプチド断片群と比較した場合1/100程度の活性しか示さず、明らかに、本願発明の細胞死抑制活性を示すペプチド断片又はペプチド断片群が優位な活性を示した。図7参照のこと。

さらに、抗体アフィニティーカラムを用いて調製された完全長セレノプロテインPとの上記と同じ評価系での細胞死抑制活性の比較では、断片化された本願発明のペプチド断片又はペプチド断片群の、比活性で80倍以上という顕著な優位性が示され、「断片化」の意義を確認することができた。表3参照のこと。

表3

試料	蛋白濃度($\mu\text{g/ml}$)	活性	比活性
完全長セレノプロテインP	40	<100	<2500
本願発明ペプチド断片	10	2000	200000

実施例9

(他の抗酸化剤との活性比較)

脂質酸化の抗酸化剤として一般的に有用であるとされているビタミンE及び過酸化水素の除去に働いているカタラーゼについて、本願発明のHSA存在下、無血清培養下で誘導される細胞死をどの程度抑制するものか検討した。

無血清培地SFO3(三光純薬)(0.05 μM 2ME加、0.1%BSA含)で継代可能なDam細胞(1×10^6 細胞/dish/3ml)1mlにRPMI 1640/D-MEM/F-12の1:2:2混合培地(SA培地)を2ml添加後、3日間培養し、アッセイ時にその細胞を回収した。その細胞を50%PBS/SA/0.03%HSA(SIGMA社)により2回洗浄し、同培地で $3 \times 10^4/\text{ml}$ になるように懸濁後、細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ190 μl 、段階希釈のためのウェルには100 μl ずつを、96wellプレートに分注した。

アッセイ試料として20 μM のビタミンE、カタラーゼ及びセレノプロテインP断片をそれぞれサンプル添加ウェルに10 μl ずつ添加し、攪拌後、100 μl 細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈を行なった。培養は37℃の

CO₂インキュベーターで4～5日間行ない、判定した。アッセイの評価法としては培養4日目以降、細胞死抑制に必要な試料濃度の相対比較を実施した。その結果、カタラーゼは細胞死抑制活性は示さず、ビタミンEは125 nMまでは細胞死を抑制したが62 nMでは細胞死を抑制できなかった。これに対してセレノ
5 プロテインP断片は60 pMまで細胞死を抑制することが可能であった。また、この結果より、ビタミンEで細胞死が抑制されたことから本願アッセイ系においてはHSA(SIGMA)に結合している脂肪酸類の過酸化が細胞死を誘導していると予想され、さらに、ビタミンEよりも効果的に細胞死を抑制するセレノプロ
10 テインP断片はビタミンEが有効である現象に対してなお有効に作用することが予想された。図8参照のこと。

実施例10

(脂肪酸により誘導される細胞死の抑制活性)

種々の二重結合を分子内に2個以上有する長鎖の脂肪酸(例えば、
eicosadienoic acid, dihomog- γ -linolenic acid, docosadienoic acid,
15 docosatrienoic acid, adrenic acid, eicosapentaenoic acid,
docosahexaenoic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidonic acid)は
全て、セレノプロテインP非存在下の無血清培養において10 μ Mの濃度で細胞
死を誘導した。この中で、強く細胞死を誘導するアラキドン酸(arachidonic
acid)、リノール酸(linoleic acid)及びリノレン酸(linolenic acid)についてそ
20 れらが細胞死を誘導する濃度、並びにそれを抑制するセレノプロテインPの濃度
について詳細に検討した。

無血清培地SFO3(三光純薬)(0.05 μ M 2ME加、0.1%BSA含)で継
代可能なDami細胞(1×10^6 細胞/dish/3ml)1mlにRPMI
1640/D-MEM/F-12の1:2:2混合培地(SA培地)を2ml添加
25 後、3日間培養し、アッセイ時にその細胞を回収した。その細胞をSA/0.05%
脱脂肪酸BSA(和光純薬社)により2回洗浄し、2～16 μ Mのアラキドン
酸、リノール酸及びリノレン酸を含有する同培地で 3×10^4 /mlになるよう
に懸濁後、細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ198 μ l、段階希釈のための
ウェルには100 μ lずつを96wellプレートに分注した。これに100 μ

Mのアッセイ試料をそれぞれサンプル添加ウェルに2 μ lずつ添加し攪拌後、100 μ l細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。培養は37°CのCO₂インキュベーターで4~5日間行い、細胞死誘導とセレノプロテインP断片による細胞死抑制の評価を1 μ MのセレノプロテインP及びその希釈倍率による有効濃度を比較した。

アラキドン酸、リノール酸等の多価の不飽和脂肪酸が4 μ M以上存在する条件下で細胞の無血清培養を実施すると細胞死が誘導され、1 μ MのセレノプロテインP断片によって完全に細胞死を抑制し得ることが判明した。図9参照のこと。4 μ Mのリノール酸が存在する条件下でビタミンEが細胞死を抑制する有効濃度が100 nM程度であるのに対し、全長セレノプロテインPが同等の約100 nM程度、セレノプロテインP断片が10 pMとセレノプロテインP断片が最も低濃度で有効性を示した。図10参照のこと。抗酸化剤であるビタミンEを添加することにより細胞死を抑制したことから、おそらく細胞内外で過酸化を受けた脂肪酸が細胞に損傷を与えることにより細胞死が惹起され、セレノプロテインP断片は効率的にこれを抑制しているものと考えられる。

また、4 μ Mのリノール酸又はリノレン酸存在下で生じるDam細胞の細胞死の抑制効果の有無を種々の酸化還元に関する酵素類(グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンレダクターゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、カタラーゼ)について検討したところ、グルタチオンペルオキシダーゼにおいて、リノール酸存在下で生じる細胞死を250 nM以上で抑制し、リノレン酸存在下で生じる細胞死を500 nM以上で抑制したが、他の酵素類は1 μ Mの濃度でも細胞死抑制効果は観察されなかった。同条件下でセレノプロテインP断片が10 pMという低濃度でも細胞死を抑制することから、セレノプロテインP断片の際だった有効性が明らかとなった。また、この細胞死を誘導する脂肪酸の濃度を変化させることにより、感受性の異なる種々の細胞への脂肪酸の影響及びセレノプロテインPの影響を観察することができた。通常、20 μ Mのリノール酸を添加すると細胞死が誘導され、この濃度で細胞死が誘導されない細胞はセレノプロテインPが発現している可能性が高い。この系を利用することにより、種々の細胞における脂肪酸によって誘導される細胞死の

抑制効果を評価することができる。この系は、HSA(S I GMA社)添加時に誘導される細胞死と同じ現象を反映していると推察された。

これまでの実験により、巨核球系細胞株(D a m i)、T細胞系細胞株(M o l t 4、C E M、J u r k a t)、B細胞系細胞株(P3X63AG8.653、P3X63AG8.U1)、
5 肝臓系細胞株(H e p G 2)、神経系細胞株(I M R 3 2)、腎臓系細胞株(C R L 1 9 3 2)等で本願発明のセレノプロテインP断片の効果が確認された。このことから、セレノプロテインP断片は、免疫系、神経系、造血系の細胞及び臓器由来の細胞に対して細胞死抑制の有効性を示すことが強く期待される。

実施例 1 1

10 (細胞死抑制物質の細胞培養時の添加物としての効果)

種々の細胞株(巨核球系細胞株：D a m i；肝臓由来細胞株：H e p G 2；子宮由来細胞株：H e l a；腎臓由来細胞株：C R L 1 9 3 2；組織性リンパ球細胞株：U 9 3 7；T細胞系細胞株：J u r k a t、M o l t 4、C E M；線維芽細胞株：L 9 2 9；単球系細胞株：T H P - 1；B細胞系細胞株：P3X63AG8.653、
15 P3X63AG8.U1；神経系細胞株：I M R 3 2)をR P M I 1 6 4 0/D-MEM/F-1 2(1：2：2)培地(トランスフェリン、インシュリン、亜セレン酸ナトリウム不含)で、セレノプロテインP断片の有無の条件下で培養した。その結果は、全ての細胞において、セレノプロテインP断片の存在下では細胞状態の悪化が観察されないか悪化を抑え得ることが判明した。表4参照のこと。加えて、トランスフェリン、インシュリン存在下では全ての細胞状態の維持が可能となり、更に
20 加えて0.05%B S A存在下ではより効果的であった。

また、抗セレノプロテインP抗体固定化担体を用いてセレノプロテインPを完全に除去したヒト血清5%存在条件でJ u r k a t細胞を培養した際、当該細胞の増殖が悪化し細胞内抗酸化酵素の1種である細胞内グルタチオンペロキシダーゼ活性の低下が観察されたが、これにセレノプロテインP断片を添加することにより、細胞増殖及びグルタチオンペロキシダーゼ活性を正常に戻すことができた。
25 なお、亜セレン酸ナトリウムでもこの効果は観察されたが、セレノプロテインP断片の効果はこれを凌いだ。また、セレン化合物であるエブセレンにはこの効果は観られなかった。以上のことから、セレノプロテインP断片で亜セレン酸ナト

リウムを代替することが可能で、細胞培養時の添加物として有用であることが判った。

表 4
無血清条件培養におけるセレノプロテインP断片の効果

	Dami	HepG2	HeLa	CRL1932	U937	Jurkat	Molt4
SeP(+)	◎	○	○	◎	◎	○	○
SeP(-)	○	×	△	△	○	×	×
	CEM	L929	THP-1	P3X63AG8.653	P3X63AG8.U1	IMR32	
SeP(+)	○	◎	◎	△	△	○	
SeP(-)	×	○	○	×	×	△	

◎ : 細胞状態最良
○ : 細胞状態良
△ : 細胞ダメージ有り
× : 死滅

SeP:セレノプロテインP断片

請 求 の 範 囲

1. セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸残基からなる配列又は当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列又は前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列を有する、細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群。

2. 式(I):

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala
Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1) 及び/又は

式(II):

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser
Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2)

(式中、Xaa はセレノシステインを表す) で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有する、請求項1記載のペプチド断片又はペプチド断片群。

3. 血漿蛋白質に由来する請求項1又は請求項2に記載のペプチド断片又はペプチド断片群。

4. (a)分子量分画膜に基づき10～30kDaの分子量画分に回収され、(b)イオン交換樹脂への結合性の検討の結果、血中でpH7からpH8の間に等電点を示す構造とpH8以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系SDS-PAGEでは分子量13～14kDaの2本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された16～17kDaの2本のバンドを示し、また(d)還元条件下でのSDS-PAGEでは、前記バンドに加えて3～4kDa、7～9kDa及び10～12kDaのバンドを呈する、請求項1から請求項3のいずれかに記載のペプチド断片又はペプチド断片群。

5. 還元条件下でのSDS-PAGEにおいて、3～4kDa、7～9kDa及び10～12kDaのバンドに相当する、請求項1から請求項4のいずれかに記載のペプチド断片又はペプチド断片群。

6. 請求項1から請求項5のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群を主要構成成分とする、細胞死が関与する疾患の病態悪

化阻止、予防又は治療剤。

7. 前記細胞死が関与する疾患が、AIDS、パーキンソン病、アルツハイマー病、動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞、臓器移植等再灌流傷害より選択される、請求項6記載の病態悪化阻止、予防又は治療剤。

5 8. 請求項1から請求項5のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群を主要構成成分とする、酸化還元反応が関与する疾患の病態悪化阻止、予防又は治療剤。

9. 請求項1から請求項5のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群を主要構成成分とする、免疫系細胞が関与する疾患の病態悪化阻止、予防又は治療剤。

10 10. 請求項1から請求項5のいずれかに記載の細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群を主要構成成分とする、細胞培養用添加剤。

11. 0.01～0.5%アルブミン添加無血清培地を用いたヒト巨核芽球系細胞培養系における細胞突然死現象を利用し、細胞死抑制活性を有する物質を添加してその際の細胞死抑制の程度を評価する、細胞死抑制活性のスクリーニング方法。

15 12. セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸残基からなる配列又は当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列又は前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列からなる、細胞死抑制活性を有するペプチド断片又はペプチド断片群に対する抗体。

20 13. 前記ペプチド断片又はペプチド断片群が
式(I):

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala
Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1) 及び/又は
式(II):

25 Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser
Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2)

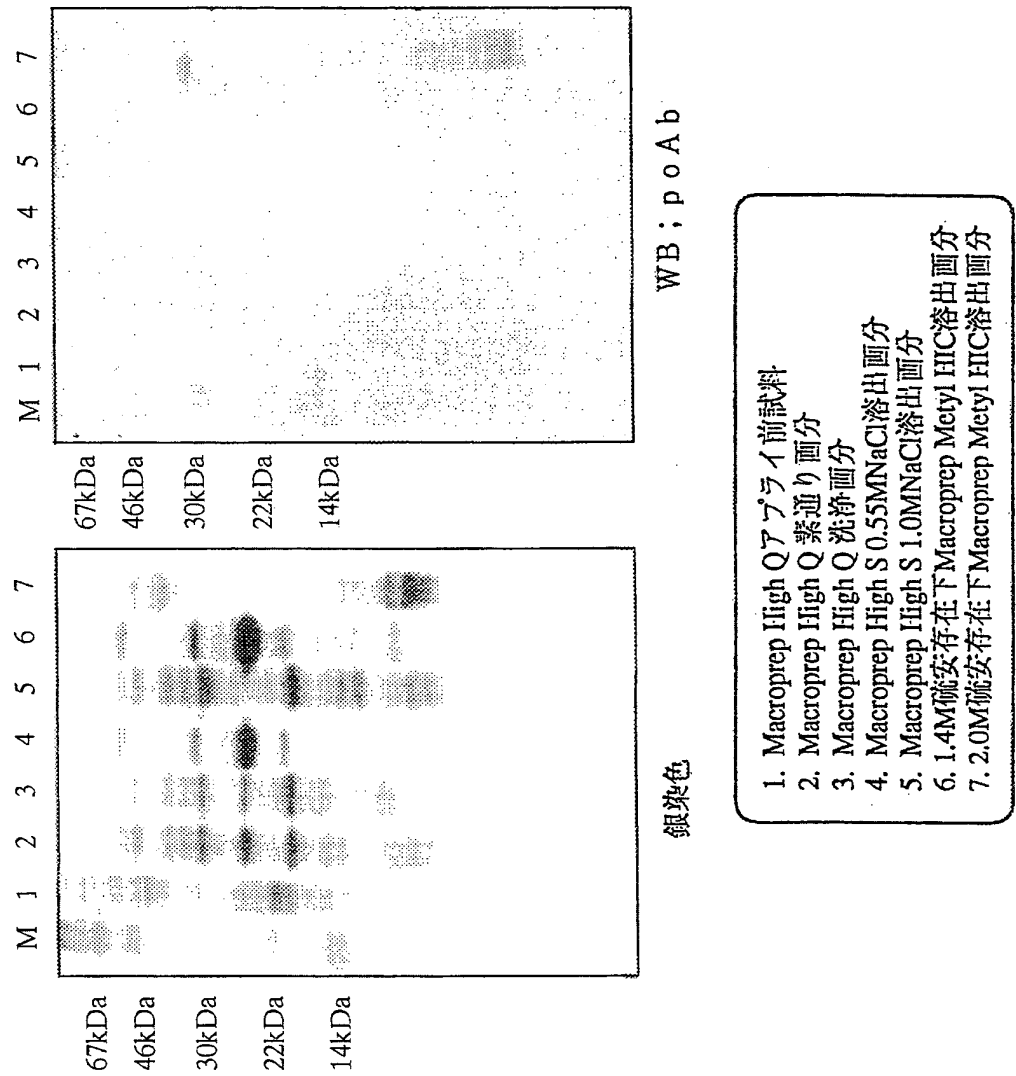
(式中、Xaa はセレノシステインを表す) で表されるアミノ酸配列もしくは当該アミノ酸配列の部分配列を有する、請求項12記載の抗体。

14. 前記ペプチド断片又はペプチド断片群が血漿蛋白質に由来するものである、

請求項 1 2 又は請求項 1 3 に記載の抗体。

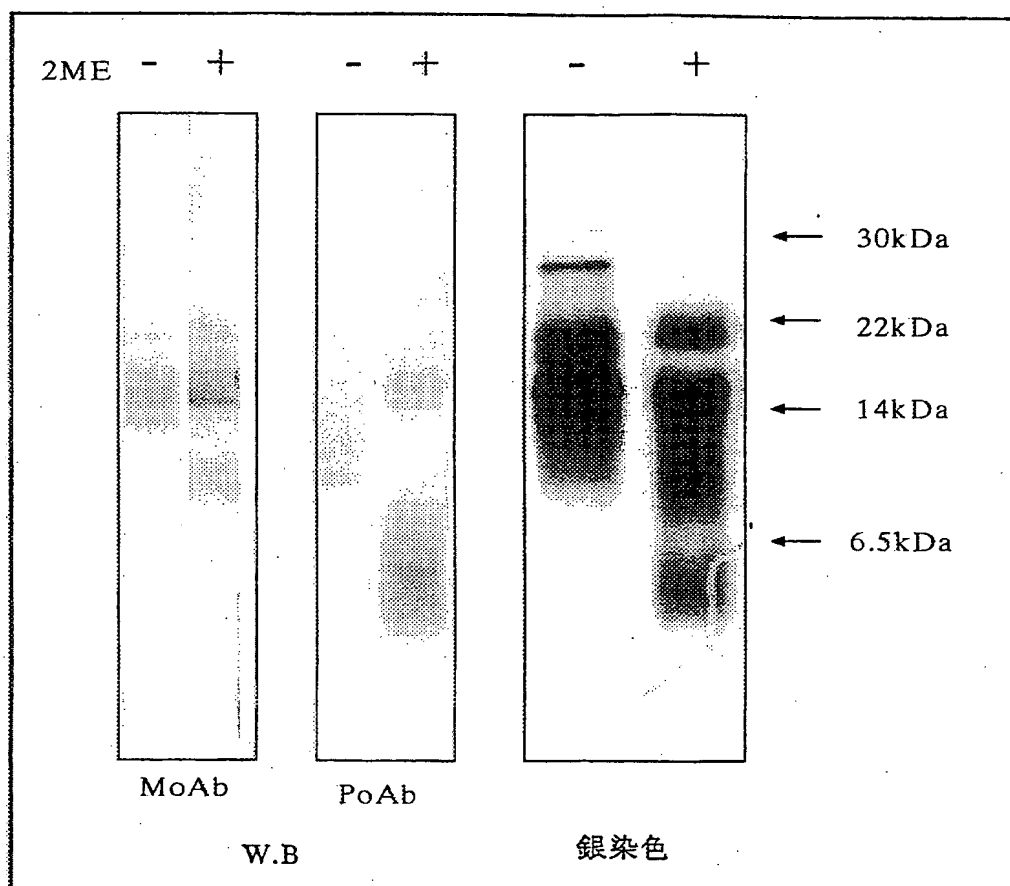
- 1 5. 前記ペプチド断片又はペプチド断片群が、(a)分子量分画膜に基づき 1 0 ~ 3 0 k D a の分子量画分に回収され、(b)イオン交換樹脂への結合性の検討の結果、血中で p H 7 から p H 8 の間に等電点を示す構造と p H 8 以上に等電点を示す構造を有し、(c)非還元系 S D S - P A G E では分子量 1 3 ~ 1 4 k D a の 2 本のバンド及びそれらに糖鎖の付加された 1 6 ~ 1 7 k D a の 2 本のバンドを示し、また(d)還元条件下での S D S - P A G E では、前記バンドに加えて 3 ~ 4 k D a 、 7 ~ 9 k D a 及び 1 0 ~ 1 2 k D a のバンドを呈することを特徴とする、請求項 1 2 から請求項 1 4 のいずれかに記載の抗体。

図 1



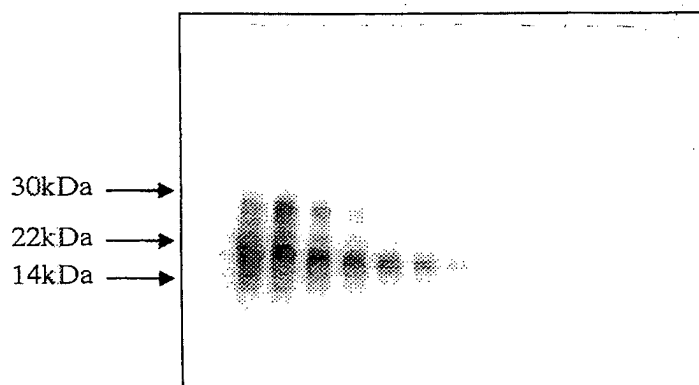
2/10

図 2



BEST AVAILABLE COPY

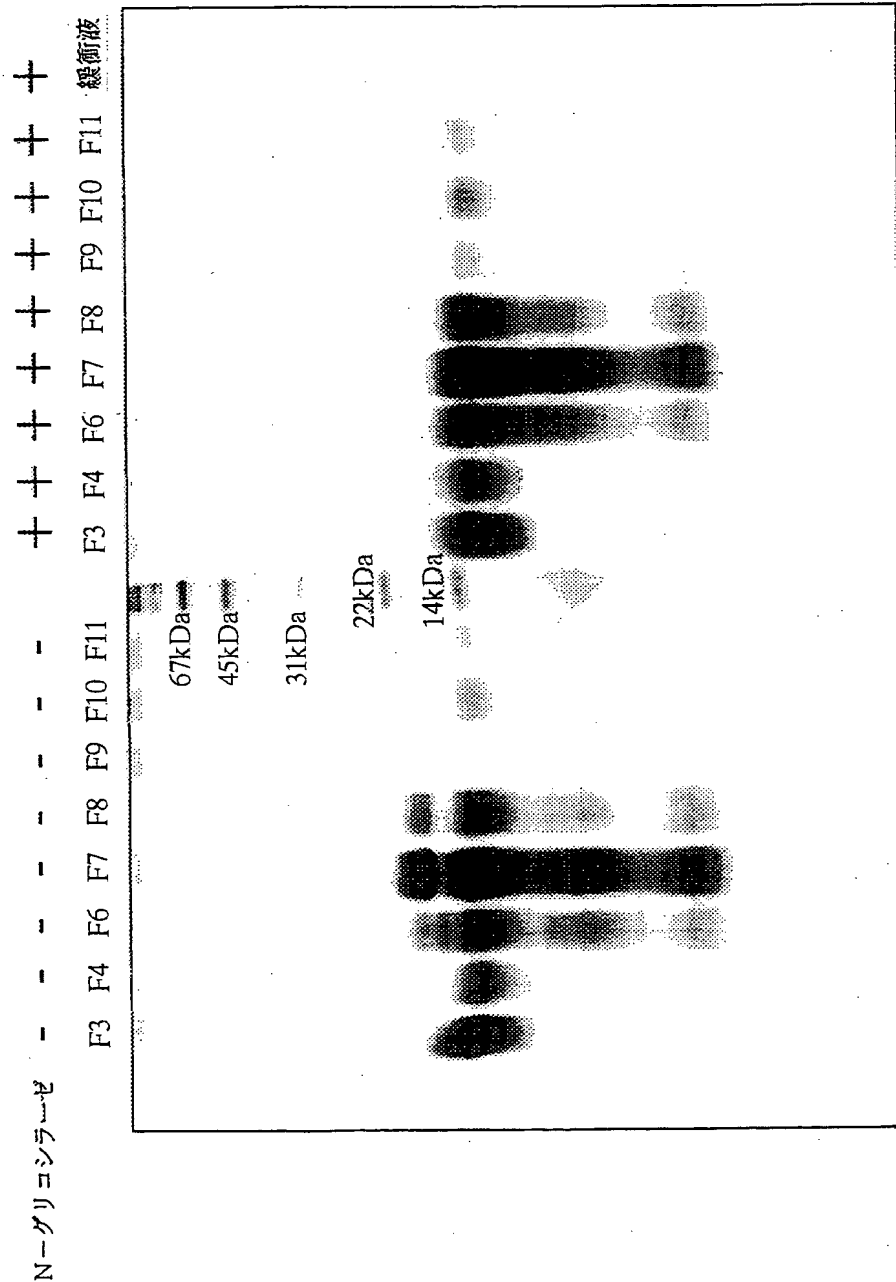
銀染色



アプライ量を変えた精製セレノプロテインP断片
の非還元SDS-PAGEのパターン

4/10

図 4

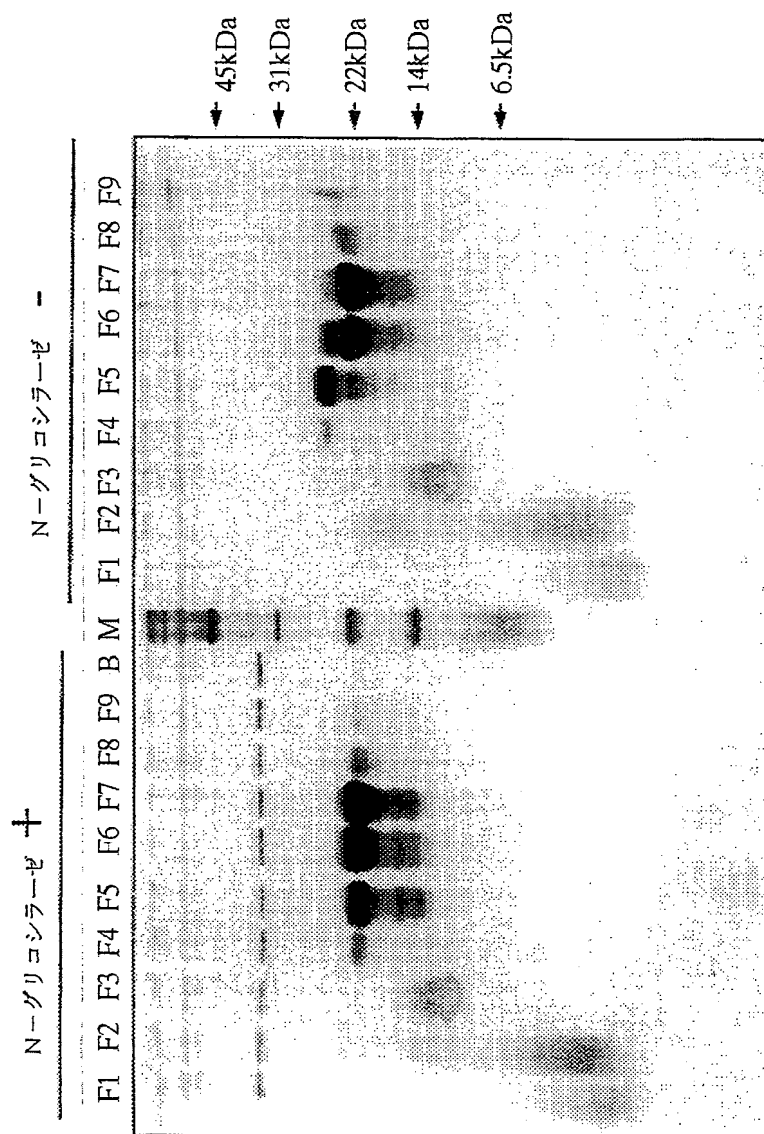


BEST AVAILABLE COPY

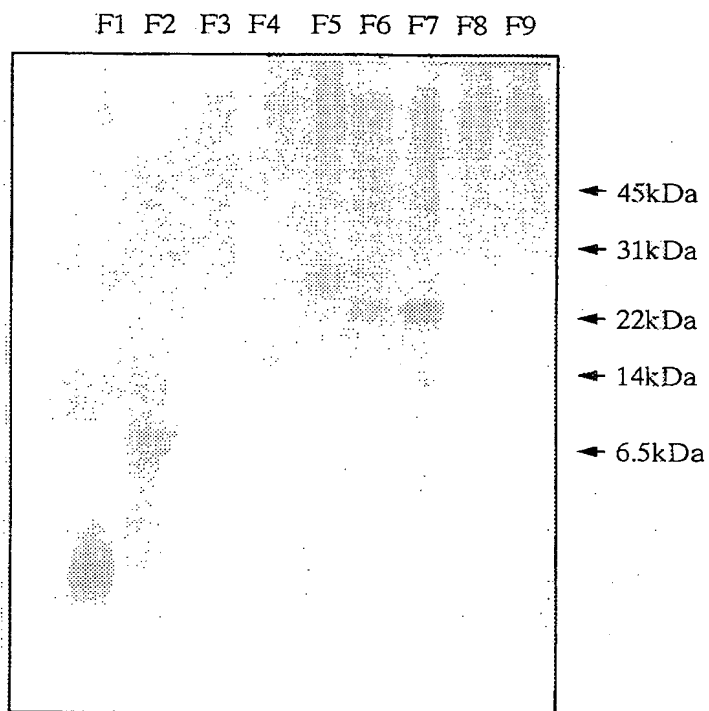
5/10

☒ 5

還元SDS-PAGE 銀染色



W.B:PoAb

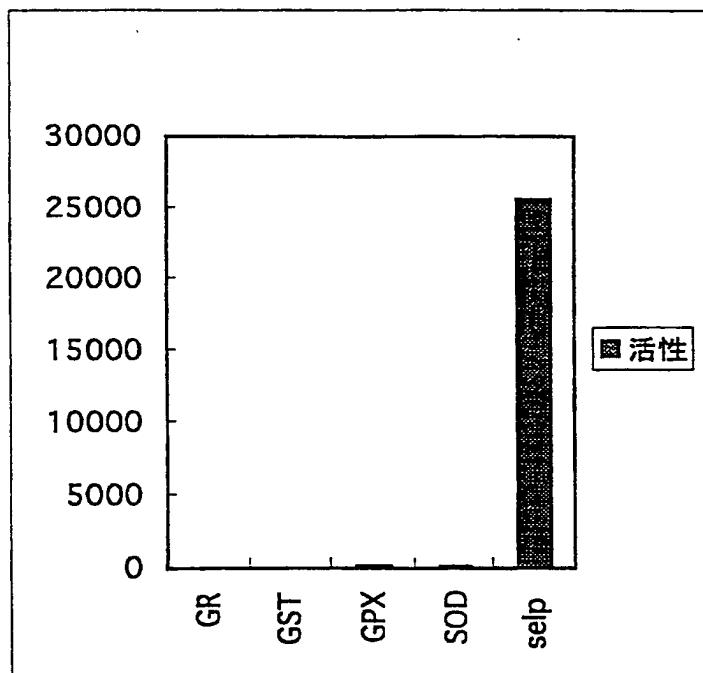


7/10

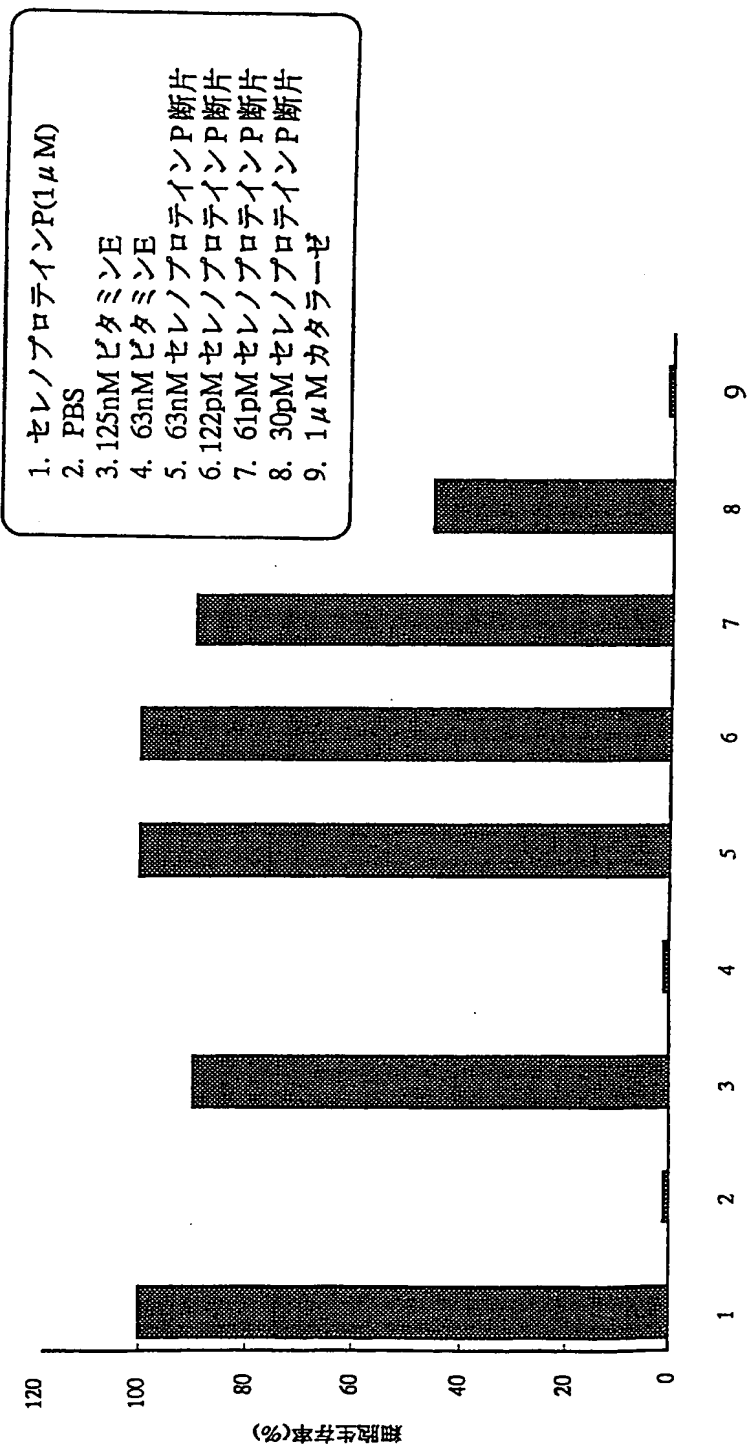
図 7

1. グルタチオンレダクターゼ (GR)
2. グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST)
3. グルタチオンペロキシダーゼ (GPX)
4. スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)
5. セレノプロテイン P 断片 (selp)

	活性
GR	0
GST	0
GPX	100
SOD	200
selp	25600

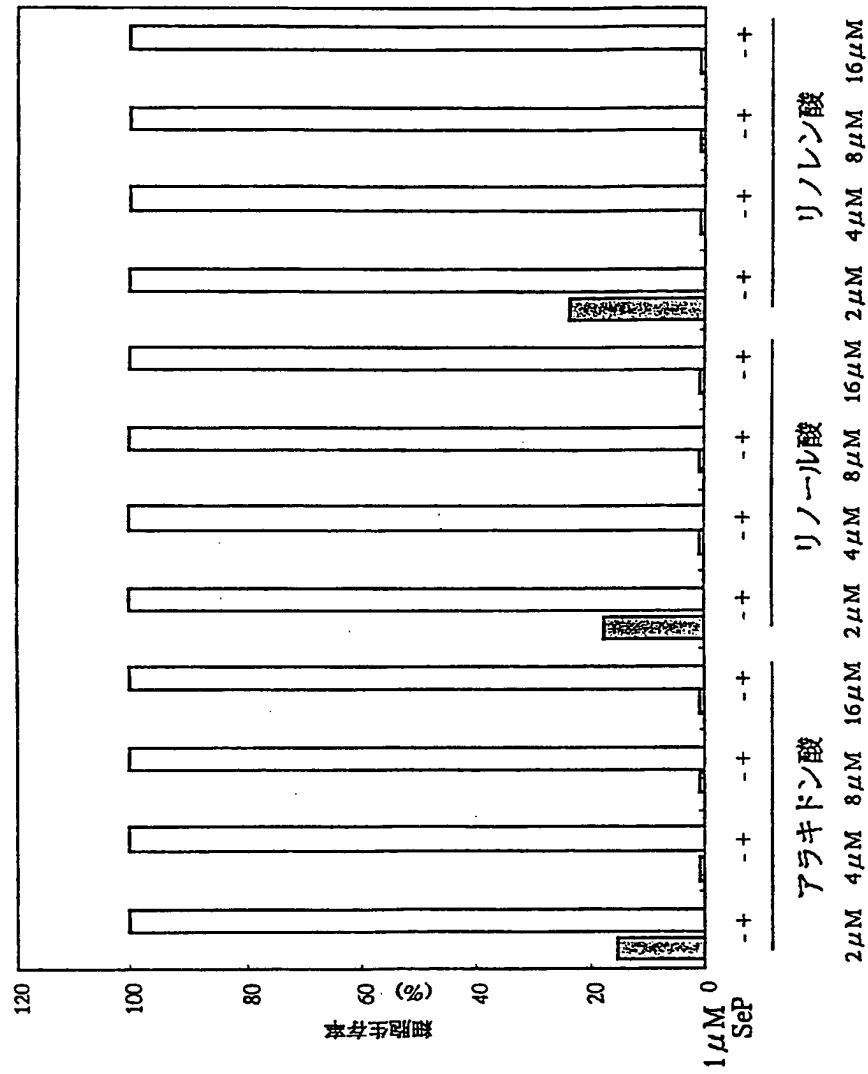


Dami細胞の0.03% HSA(SIGMA)存在下での無血清培養



9/10

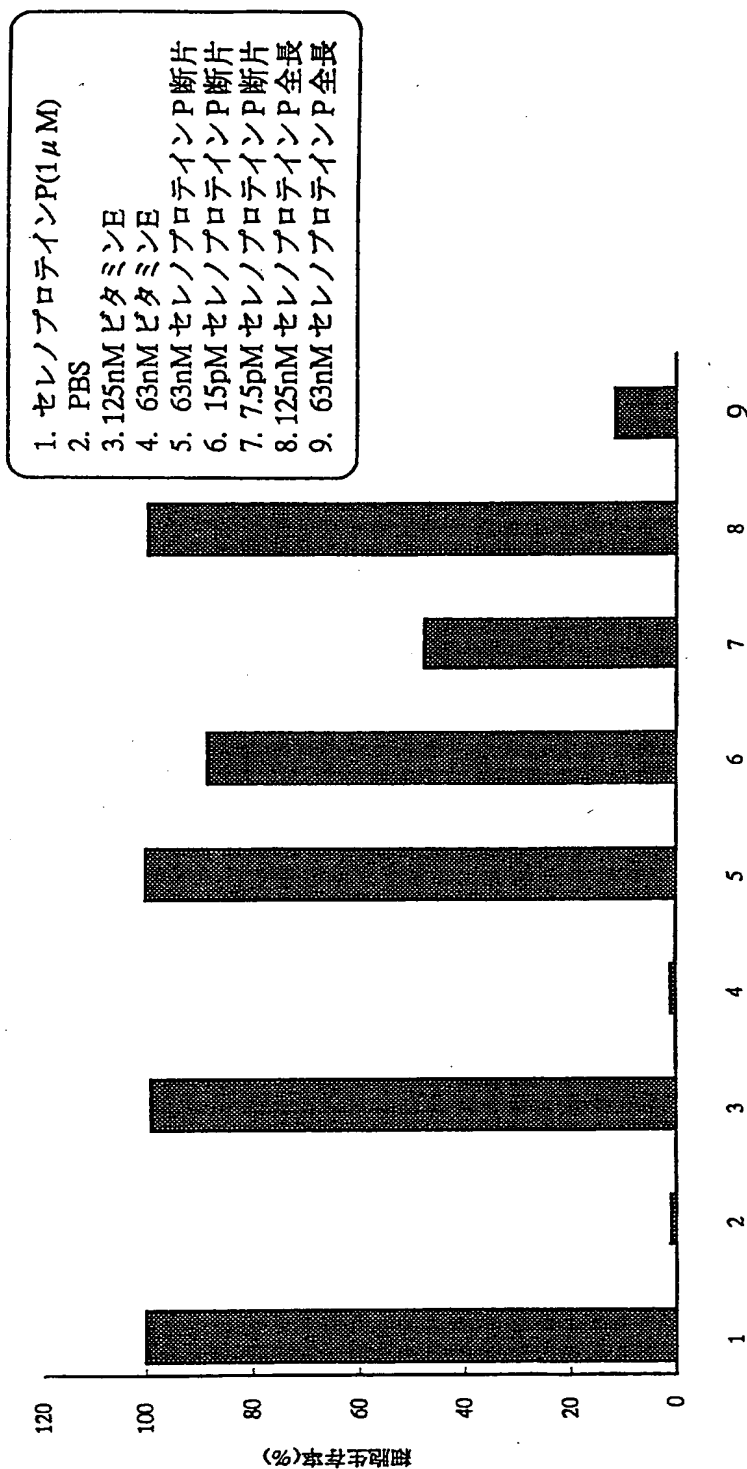
図 9



10/10

図 10

4 μ M リノール酸含有0.05%脱脂脂肪酸BSA存在下でのDami細胞の無血清培養



SEQUENCE LISTING

<110> The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute

<120> Peptide Fragments Having Inhibitory Activity to Cellular Death

<130> 661608

<150> JP 10-347863

<151> 1998-11-19

<160> 7

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 1

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu

20 25

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 2

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu

1 5 10 15

Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

20

25

<210> 3

<211> 103

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 3

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu

20 25 30

Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser

35 40 45

Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser

50 55 60

Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu

65 70 75 80

Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn Gln Ala Lys

85 90 95

Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn

100

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Human plasma

<400> 4

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1 5 10 15

Leu Ala Pro Arg

20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Human plasma

<400> 5

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu

1

5

10

15

Leu Ala Pro Arg Ser

20

<210> 6

<211> 371

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 6

Met Trp Arg

Ser Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Cys Leu Leu Pro Ser Gly Gly Thr

-15

-10

-5

-1

Glu Ser Gln Asp Gln Ser Ser Leu Cys Lys Gln Pro Pro Ala Trp Ser

1

5

10

15

Ile Arg Asp Gln Asp Pro Met Leu Asn Ser Asn Gly Ser Val Thr Val

20

25

30

Val Ala Leu Leu Gln Ala Ser Xaa Tyr Leu Cys Ile Ile Glu Ala Ser

35

40

45

Lys Leu Glu Asp Leu Arg Val Lys Leu Lys Lys Glu Gly Tyr Ser Asn

50	55	60	
Ile Ser Tyr Ile Val Val Asn His Gln Gly Ile Ser Ser Arg Leu Lys			
65	70	75	80
Tyr Thr His Leu Lys Asn Lys Val Ser Glu His Ile Pro Val Tyr Gln			
85	90	95	
Gln Glu Glu Asn Gln Thr Asp Val Trp Thr Leu Leu Asn Gly Ser Lys			
100	105	110	
Asp Asp Phe Leu Ile Tyr Asp Arg Cys Gly Arg Leu Val Tyr His Leu			
115	120	125	
Gly Leu Pro Phe Ser Phe Leu Thr Phe Pro Tyr Val Glu Glu Ala Ile			
130	135	140	
Lys Ile Ala Tyr Cys Glu Lys Lys Cys Gly Asn Cys Ser Leu Thr Thr			
145	150	155	160
Leu Lys Asp Glu Asp Phe Cys Lys Arg Val Ser Leu Ala Thr Val Asp			
165	170	175	
Lys Thr Val Glu Thr Pro Ser Pro His Tyr His His Glu His His His			
180	185	190	
Asn His Gly His Gln His Leu Gly Ser Ser Glu Leu Ser Glu Asn Gln			
195	200	205	
Gln Pro Gly Ala Pro Asn Ala Pro Thr His Pro Ala Pro Pro Gly Leu			
210	215	220	
His His His His Lys His Lys Gly Gln His Arg Gln Gly His Pro Glu			
225	230	235	240
Asn Arg Asp Met Pro Ala Ser Glu Asp Leu Gln Asp Leu Gln Lys Lys			
245	250	255	
Leu Cys Arg Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr			
260	265	270	
Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu			
275	280	285	

Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn

290

295

300

Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

305

310

315

320

Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser

325

330

335

Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa Lys Asn

340

345

350

Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn

355

360

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 7

Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu

1

5

10

15

Cys Ser Xaa Gln

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/06, C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/06, C07K 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HILL, K.E. et al. "Conserved nucleotide sequence in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA", Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. (1993) Vol.90, No.2, p.537-541	12-15 1-10
X A	AKESSON, B. et al. "Purification of selenoprotein P from human plasma", Biochim. Biophys. Acta (1994) Vol.1204, No.2, p.243-249	12-15 1-10
X A	HILL, K.E. et al. "Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and selenium-supplemented Chinese subjects", J.Nutr. (1996) Vol.126, No.1, p.138-145	12-15 1-10
X A	PERSSON-MOSCHOS, M. et al. "Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status", Analyst (1995) Vol.120, No.3, p.833-836	12-15 1-10
X A	ARTEEL, G.E. et al. "Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration", Biol. Chem. (1998. Aug-Sep.) Vol.379, No.8-9,	12-15 1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 January, 2000 (12.01.00)Date of mailing of the international search report
25 January, 2000 (25.01.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06322

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	p.1201-1205 ZURBONSEN, K. et al., "Apoptotic effects of imidazo [1,2-a]pyrazine derivatives in the human Dami cell line", Eur.J.Pharmacol.919970Vol.320, No.2-3, p.215-221	11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06322

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1 to 10 and 12 to 15 relate to peptide fragments having an activity of inhibiting cell death which contain the sequence consisting of 103 amino acid residues in the C-terminal side of selenoprotein P or a partial sequence thereof, drugs for inhibiting worsening, preventing or treating diseases which contain the above peptide fragments, additives for cell culture which contain the above peptide fragments and antibodies against the above peptide fragments.
2. Claim 11 relates to a method for screening the cell death inhibitory activity of a substance having a cell death inhibitory activity with the use of a human megakaryocytic cell culture system.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06322

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/06, C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K 14/47, A61K 38/17, C12N 5/06, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	HILL, K. E. et al. "Conserved nucleotide sequence in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA", Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. (1993) Vol. 90, No. 2, p. 537-541	12-15 1-10
X A	AKESSON, B. et al. "Purification of selenoprotein P from human plasma", Biochim. Biophys. Acta (1994) Vol. 1204, No. 2, p. 243-249	12-15 1-10
X A	HILL, K. E. et al. "Selenoprotein P concentration in plasma is an index of selenium status in selenium-deficient and seleni-um-supplemented Chinese subjects", J. Nutr. (1996) Vol. 126, No. 1, p. 138-145	12-15 1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.01.00

国際調査報告の発送日

25.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高畑 栄二

4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	PERSSON-MOSCHOS, M. et al. "Selenoprotein P in serum as a biochemical marker of selenium status", Analyst (1995) Vol. 120, No. 3, p. 833-836	<u>12-15</u> <u>I-10</u>
<u>X</u> A	ARTEEL, G. E. et al. "Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration", Biol. Chem. (1998. Aug-Sep.) Vol. 379, No. 8-9, p. 1201-1205	<u>12-15</u> <u>I-10</u>
X	ZURBONSEN, K. et al. "Apoptotic effects of imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives in the human Dami cell line", Eur. J. Pharmacol. (1997) Vol. 320, No. 2-3, p. 215-221	11

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 請求の範囲1-10、12-15は、セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸残基からなる配列又はその部分配列を有する細胞死抑制活性を有するペプチド断片、前記ペプチド断片を構成成分とする疾患の病態悪化阻止、予防又は治療剤、前記ペプチド断片を構成成分とする細胞培養用添加剤、前記ペプチド断片に対する抗体に関するものである。
2. 請求の範囲11は、ヒト巨核芽球系細胞培養系を用いた細胞死抑制活性を有する物質の細胞死抑制活性のスクリーニング方法に関するものである。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。